

10/500034  
Rec'd PCTO 24 JUN 2004  
PCT/JP02/13562#2

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

25.12.02

REC'D 03 MAR 2003

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて  
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed  
with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2001年12月27日

出 願 番 号

Application Number:

特願2001-395981

[ST.10/C]:

[JP2001-395981]

出 願 人

Applicant(s):

アークレイ株式会社

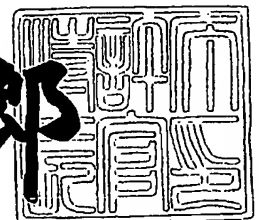
PRIORITY  
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 2月12日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3005897

【書類名】 特許願

【整理番号】 P13-405Z27

【提出日】 平成13年12月27日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 G01N 33/50  
G01N 33/53

【発明の名称】 濃度測定方法

【請求項の数】 12

【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市南区東九条西明田町 5 7 アークレイ株式  
会社内

【氏名】 福永 悟志

【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市南区東九条西明田町 5 7 アークレイ株式  
会社内

【氏名】 中山 真人

【特許出願人】

【識別番号】 000141897

【住所又は居所】 京都府京都市南区東九条西明田町 5 7

【氏名又は名称】 アークレイ株式会社

【代理人】

【識別番号】 100086380

【弁理士】

【氏名又は名称】 吉田 稔

【連絡先】 0 6 - 6 7 6 4 - 6 6 6 4

【選任した代理人】

【識別番号】 100103078

【弁理士】

【氏名又は名称】 田中 達也

【選任した代理人】

【識別番号】 100105832

【弁理士】

【氏名又は名称】 福元 義和

【選任した代理人】

【識別番号】 100117167

【弁理士】

【氏名又は名称】 塩谷 隆嗣

【選任した代理人】

【識別番号】 100117178

【弁理士】

【氏名又は名称】 古澤 寛

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 024198

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0103432

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 濃度測定方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 測定対象物質およびこの物質と反応し得る反応物質を含む反応系からの出力値に基づいて、複数の検量線の中から上記測定対象物質の濃度演算に最も適合した最適検量線を選択し、かつ当該最適検量線を用いて、上記出力値に基づいて上記測定対象物質の濃度演算を行う濃度測定方法であって、

上記複数の検量線は、相互に異なる反応時間を基礎として作成されたものであることを特徴とする、濃度測定方法。

【請求項 2】 上記複数の検量線は、上記測定対象物質の濃度が予め定められた濃度用閾値よりも大きいと予想される場合に選択される第 1 検量線と、上記濃度用閾値よりも小さいと予想される場合に選択される第 2 検量線と、を有しており、かつ、

上記第 1 検量線は、濃度が既知の標準物質と上記反応物質との反応の初期段階において測定される出力値に基づいて作成されている一方、上記第 2 検量線は、上記第 1 検量線の作成の基礎となった出力値の測定時よりも後において測定される出力値に基づいて作成されている、請求項 1 に記載の濃度測定方法。

【請求項 3】 上記第 2 検量線を用いて演算された第 2 濃度演算値が、上記濃度用閾値よりも大きいと予想される場合には、上記第 1 検量線を用いて演算された第 1 濃度演算値と、上記第 2 濃度演算値とを比較し、値の大きなほうの演算値を最終的な演算値として採用する、請求項 2 に記載の濃度測定方法。

【請求項 4】 上記第 2 検量線を用いて演算された第 2 濃度演算値が、上記濃度用閾値よりも小さいと予想される場合には、上記第 2 濃度演算値が上記測定対象物質の濃度を反映したものであるか否かを判断し、

上記第 2 濃度演算値が上記測定対象物質の濃度を反映している場合には、上記第 2 濃度演算値を最終的な演算値として採用する一方で、上記第 2 濃度演算値が上記測定対象物質の濃度を反映していない場合には、上記第 1 検量線を用いて演算された第 1 濃度演算値を最終的な演算値として採用する、請求項 2 または 3 に記載の濃度測定方法。

【請求項5】 上記第1検量線を用いて演算された第1濃度演算値が上記濃度用閾値よりも大きいと予想される場合には、上記第1濃度演算値を最終的な演算値として採用する一方、

上記第1濃度演算値が上記濃度用閾値よりも小さいと予想される場合には、上記第2検量線を用いて演算された第2濃度演算値を最終的な演算値として採用する、請求項2に記載の濃度測定方法。

【請求項6】 上記測定対象物質の濃度が上記濃度用閾値よりも大きいか小さいかの予想は、上記出力値が予め定められた出力値用閾値よりも大きいか小さいかに基づいて行う、請求項2ないし5のいずれかに記載の濃度測定方法。

【請求項7】 上記濃度演算用閾値は、上記第2検量線の直線性が高い濃度範囲内に設定される、請求項2ないし6のいずれかに記載の濃度測定方法。

【請求項8】 上記濃度演算用閾値は、上記第1検量線と上記第2検量線との交点に対応する濃度に設定される、請求項2ないし6のいずれかに記載の濃度測定方法。

【請求項9】 上記複数の検量線は、濃度が既知の標準試薬と上記反応物質とを含む標準反応系の出力値を、濃度の異なる複数の標準試薬のそれぞれについて一定時間毎に複数の測定点において測定することにより、各測定点毎に作成されたものであり、

上記最適検量線の選択は、上記測定対象物質と上記反応物質との反応の初期段階である時間範囲内において測定される出力値に基づいて行われる、請求項1に記載の濃度測定方法。

【請求項10】 測定対象物質およびこの物質と反応し得る反応物質を含む反応系からの出力値と、上記測定対象物質の濃度と出力値との関係を示す検量線とに基づいて、上記測定対象物質の濃度演算を行う濃度測定方法であって、

上記検量線は、濃度が既知の標準試薬と上記反応物質とを含む標準反応系の出力値を、濃度の異なる複数の標準試薬のそれぞれについて特定時間範囲内において経時的に測定し、各濃度の標準試薬を用いた場合における出力値のピーク値の集合に基づいて作成されていることを特徴とする、濃度測定方法。

【請求項11】 測定対象物質およびこの物質と反応し得る反応物質を含む

反応系からの出力値と、上記測定対象物質の濃度と出力値との関係を示す検量線とに基づいて、上記測定対象物質の濃度演算を行う濃度測定方法であって、

上記検量線は、濃度が既知の標準物質と上記反応物質との反応の初期段階において測定される出力値に基づいて作成された第1検量線と、上記第1検量線の作成の基礎となった出力値の測定時よりも後において測定される出力値に基づいて作成された第2検量線と、を複合したものとして作成されており、かつ、

上記検量線は、上記第1検量線と上記第2検量線との交点に相当する濃度よりも大きい濃度領域については、上記第2検量線における上記濃度よりも大きい濃度領域の部分が採用され、上記濃度よりも小さい濃度領域については、上記第1検量線における上記濃度よりも小さい濃度領域の部分が採用されていることを特徴とする、濃度測定方法。

【請求項12】 上記出力値は、上記反応系に光を照射したときの光学的応答値である、請求項1ないし11のいずれかに記載の濃度測定方法。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【0001】

#### 【発明の属する技術分野】

本願発明は、測定対象物質およびこの物質と反応し得る反応物質を含む反応系に光を照射したときの光学的応答値と、上記測定対象物質の濃度と光学的応答値との関係を示す検量線とに基づいて、上記測定対象物質の濃度演算を行う濃度測定方法に関する。

##### 【0002】

#### 【従来の技術】

尿などの検体中の抗原濃度を測定する方法としては、抗原抗体反応と光学的手法とを組み合わせたものがある。この方法では、検体と抗体とを混合して抗原抗体反応を起こさせ、この反応系に光を照射したときの吸光度に基づいて濃度演算が行われる。この方法では、反応系の抗原濃度が小さい範囲では、濃度が大きくなるにしたがって測定される吸光度が大きくなるが、反応系の抗原濃度が大きい範囲では、濃度が大きくなるにしたがって測定される吸光度が小さくなるといった現象が見受けられる（プロゾン現象）。このような現象は、抗原抗体反応を

利用する場合に限らず、生化学的分野全般において見受けられる（以下、当該現象を生化学的分野も含めて「プロゾン様現象」と表現する。）。

【0003】

プロゾン様現象が生じる系においては、プロゾン様現象が生じているか否かを判断しなければ、実際には測定対象成分の濃度が大きいにもかかわらず、演算された結果がそれよりも小さくなってしまったといった不具合も生じる。このような不具合を解消するためには、たとえば検体を希釈した上で、吸光度を再測定する必要が生じる。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、同一の検体について複数回の測定を行うのは、抗原が高価であることに鑑みれば好ましくなく、もちろん、作業性を考慮した場合には、測定回数は少ないほうが好ましい。

【0005】

本願発明は、このような事情のもとに考えだされたものであって、プロゾン様現象などの影響を抑制しつつ、高濃度な試料液についても、簡易かつ安価に濃度測定を行うことを課題としている。

【0006】

【発明の開示】

本願発明では、上述した課題を解決すべく、次の技術手段を講じている。

【0007】

すなわち、本願発明の第1の側面により提供される濃度測定方法は、測定対象物質およびこの物質と反応し得る反応物質を含む反応系からの出力値に基づいて、複数の検量線の中から上記測定対象物質の濃度演算に最も適合した最適検量線を選択し、かつ当該最適検量線を用いて、上記出力値に基づいて上記測定対象物質の濃度演算を行う濃度測定方法であって、上記複数の検量線は、相互に異なる反応時間を基礎として作成されたものであることを特徴としている。

【0008】

好ましい実施の形態においては、上記複数の検量線は、上記測定対象物質の濃

度が予め定められた濃度用閾値よりも大きいと予想される場合に選択される第1検量線と、上記濃度用閾値よりも小さいと予想される場合に選択される第2検量線と、を有しており、かつ、上記第1検量線は、濃度が既知の標準物質と上記反応物質との反応の初期段階において測定される出力値に基づいて作成されている一方、上記第2検量線は、上記第1検量線の作成の基礎となった出力値の測定時よりも後において測定される出力値に基づいて作成されている。

## 【0009】

この場合、上記第2検量線を用いて演算された第2濃度演算値が、上記濃度用閾値よりも大きいと予想される場合には、上記第1検量線を用いて演算された第1濃度演算値と、上記第2濃度演算値とを比較し、値の大きなほうの演算値を最終的な演算値として採用するのが好ましい。一方、上記第2検量線を用いて演算された第2濃度演算値が、上記濃度用閾値よりも小さいと予想される場合には、上記第2濃度演算値が上記測定対象物質の濃度を反映したものであるか否かを判断し、上記第2濃度演算値が上記測定対象物質の濃度を反映している場合には、上記第2濃度演算値を最終的な演算値として採用する一方で、上記第2濃度演算値が上記測定対象物質の濃度を反映していない場合には、上記第1検量線を用いて演算された第1濃度演算値を最終的な演算値として採用するのが好ましい。

## 【0010】

また、上記第1検量線を用いて演算された第1濃度演算値に基づいて、第1検量線および第2検量線のうちのいずれの検量線を選択するかを決定してもよい。たとえば、第1濃度演算値が上記濃度用閾値よりも大きいと予想される場合には、上記第1濃度演算値を最終的な演算値として採用する一方、上記第1濃度演算値が上記濃度用閾値よりも小さいと予想される場合には、上記第2検量線を用いて演算された第2濃度演算値を最終的な演算値として採用するようにしてもよい。

## 【0011】

上記測定対象物質の濃度が上記濃度用閾値よりも大きいか小さいかの予想は、濃度演算を行った上で、この演算濃度と濃度用閾値とを比較することにより行ってもよいし、上記出力値が予め定められた出力値用閾値よりも大きいか小さいか



に基づいて行ってもよい。

【0012】

濃度演算用閾値は、たとえば第2検量線の直線性が高い濃度範囲内に、あるいは第1検量線と第2検量線との交点に対応する濃度に設定される。

【0013】

複数の検量線を3つ以上準備しておき、それらの中から最適検量線を選択するように構成してもよい。つまり、複数の検量線は、濃度が既知の標準試薬と上記反応物質とを含む標準反応系の出力値を、濃度の異なる複数の標準試薬のそれぞれについて一定時間毎に複数（3以上）の測定点において測定することにより、各測定点毎に作成されたものであってもよい。この場合の最適検量線を選択は、上記測定対象物質と上記反応物質との反応の初期段階である時間範囲内において測定される出力値に基づいて行うのが好ましい。

【0014】

本願発明の第2の側面においては、測定対象物質およびこの物質と反応し得る反応物質を含む反応系からの出力値と、上記測定対象物質の濃度と出力値との関係を示す検量線とに基づいて、上記測定対象物質の濃度演算を行う濃度測定方法であって、上記検量線は、濃度が既知の標準試薬と上記反応物質とを含む標準反応系の出力値を、濃度の異なる複数の標準試薬のそれぞれについて経時的に測定し、各濃度の標準試薬を用いた場合における出力値のピーク値の集合に基づいて作成されていることを特徴とする、濃度測定方法が提供される。

【0015】

本願発明の第3の側面においては、測定対象物質およびこの物質と反応し得る反応物質を含む反応系に光を照射したときの出力値と、上記測定対象物質の濃度と出力値との関係を示す検量線とに基づいて、上記測定対象物質の濃度演算を行う濃度測定方法であって、上記検量線は、濃度が既知の標準物質と上記反応物質との反応の初期段階において測定される出力値に基づいて作成された第1検量線と、上記第1検量線の作成の基礎となった出力値の測定時よりも後において測定される出力値に基づいて作成された第2検量線と、を複合したものとして作成されており、かつ、上記検量線は、上記第1検量線と上記第2検量線との交点に相

当する濃度よりも大きい濃度領域については、上記第 2 検量線における上記濃度よりも大きい濃度領域の部分が採用され、上記濃度よりも小さい濃度領域については、上記第 1 検量線における上記濃度よりも小さい濃度領域の部分が採用されていることを特徴とする、濃度測定方法が提供される。

## 【 0 0 1 6 】

出力値は、たとえば反応系に光を照射したときの応答値（光学的応答値）として得られる。もちろん、反応系に電圧を印加し、あるいは電流を流したときの電気的な応答値などであってもよい。ここで、「光学的応答値」とは、吸光度、濁度、透過度などを含む概念である。吸光度は、反応容器内に液相反応系が設定された場合において、液相反応系を透過した光の光量に基づいて決定されるものの他、多孔質体などの固相に反応系が保持形成された場合において、固相からの反射光の光量に基づいて決定されるものが含まれる。

## 【 0 0 1 7 】

## 【発明の実施の形態】

以下、本願発明の好ましい実施の形態について、図面を参照して具体的に説明する。

## 【 0 0 1 8 】

本願発明は、反応系に光を照射したときの光学的応答値と、検量線（測定対象物質の濃度と光学的応答値との関係を示すもの）とに基づいて、測定対象物質の濃度演算を行う濃度測定方法である。

## 【 0 0 1 9 】

反応系は、測定対象物質およびこの物質と反応し得る反応物質を含むものであり、これらの反応によって生成する物質によって色調や濁度などが変化する。その結果、反応の進行具合に応じて、反応系の光学的応答値が変化する。この反応系は、図 1（a）に示したように容器 10 内に反応液 11 を保持することにより構成される場合の他、図 1（b）に示したように固相 20 に反応液を保持することにより構成される場合もある。固相 20 は、たとえば紙やフェルト様部材のような吸水性に優れる材料により構成される。

## 【 0 0 2 0 】

測定対象物質としては、アルブミン、グルコース、アミラーゼ、クレアチニン、などが挙げられる。もちろん、特定の物質の濃度を測定する場合に限らず、たんぱく質の総量を測定する場合のように複数種の物質の合計量を測定する場合にも、本願発明を適用することができる。これに対して反応物質は、測定対象物質の種類に応じて適宜選択すればよい。

#### 【0021】

光学的応答値は、たとえば吸光度、濁度、あるいは透過度として得られる。図1(a)に示した反応系では、発光素子12からの光を反応系に照射したときの透過光が受光素子13において受光される。この反応系では、受光素子13での受光量と反応系への入射光量（たとえば発光素子12での発光量）に基づいて、光学的応答値が演算される。図1(b)に示した反応系では、発光素子21からの光を反応系に照射したときの反射光が受光素子22において受光される。この反応系では、受光素子22での受光量と反応系への入射光量（たとえば発光素子21での発光量）に基づいて、光学的応答値が演算される。ただし、図1(b)に示した反応系では、透過度や濁度を測定することができず、吸光度として光学的応答値が測定される。

#### 【0022】

本願発明の第1の実施の形態では、図2に示した2つの検量線(1)，(2)を使い分けて、濃度演算が行われる。検量線(1)は反応初期（高濃度（1000mg/dL）の反応液の吸光度がピークとなる時間範囲）において測定された吸光度に基づいて作成され、検量線(2)は低濃度（100mg/dL）の反応液において反応平衡に到達する時間範囲において測定された吸光度に基づいて作成されている。

#### 【0023】

図3には、0～1000mg/dLの範囲にある11種類の標準液のそれぞれについて、これを反応物質と反応させたときの吸光度の経時的変化を示した。なお、図3には、吸光度を21.5秒毎に測定した場合について、各測定点を測定ポイント1、測定ポイント2といったように表した。たとえば測定ポイント10は、反応時間が215秒（21.5秒×10）に対応している。測定ポイントと

いう用語は、以下の説明において、また他の図面においても使用されているが、これらの場合においても、先に説明したのと同様の意味で使用されている。

【0024】

反応原理としては、色素金属結合を採用した。この場合、標準液中の測定対象物質はたんぱく質とし、反応物質としては色素（プロモピロガロールレッド）と金属（インジウム）とが結合した錯体化合物を採用した。標準液は、健常者プール尿にヒト血清アルブミン（HSA）を添加して調製した。吸光度は、全自動尿成分定量分析装置（オーションマスター UM3410：アークレイ（株）製）を用いて測定した。このとき、測定波長は600nmとした。

【0025】

図3から分かるように、低濃度標準液（100mg/dL）では、測定ポイント14, 15で吸光度が一定値に漸近し、安定化している。つまり、測定ポイント14, 15で反応平衡に近い状態となっている。その一方、標準液の濃度が大きくなるにつれて、反応時間が長くなるほど吸光度が小さくなっている。つまり、プロゾン様現象が生じている。そのため、高濃度標準液（1000mg/dL）では、測定ポイントが1, 2で吸光度がピーク値に達している。

【0026】

図3の結果からは、反応液における測定対象物の濃度が大きい場合には、吸光度がピークとなる時間範囲で測定した吸光度に基づいて作成した検量線（1）を用いるのが好ましいのが分かる。これに対して、反応液における測定対象物の濃度が小さい場合には、反応が平衡に達した時間範囲で測定した吸光度に基づいて作成した検量線（2）を用いるのが好ましいのが分かる。

【0027】

また、図2の結果からは、検量線（1）については標準液の濃度が400mg/dL程度まで直線性が確保されているのに対して、検量線（2）については標準液の濃度が300mg/dL程度まで直線性が確保されている。この点からは、検量線（1）のほうが測定範囲が広いと考えられる。しかしながら、下記表1および図4に示したように、ダイナミックレンジに関していえば、検量線（1）を用いた場合よりも検量線（2）を用いた場合のほうが大きくなっている。なお

、ダイナミックレンジは、HSAの濃度が0または100mg/dLである標準液を用いて、測定ポイント1, 2および測定ポイント14, 15で吸光度を測定し、測定ポイント1, 2の平均値および測定ポイント14, 15の平均値として示した。吸光度は、標準液以外の条件を先に説明したのと同様として測定した。

【0028】

【表1】

	標準液濃度		ダイナミック レンジ
	0 (mg/dL)	100 (mg/dL)	
測定ポイント1, 2での 吸光度 (O.D.)	0.162	0.254	0.0916
測定ポイント14, 15での 吸光度 (O.D.)	0.160	0.282	0.122

【0029】

下記表2には、濃度の異なる3つ患者尿A, B, Cを用いた場合の、低濃度領域における濃度平均値、濃度の標準偏差 (SD) および濃度の相対標準偏差 (CV) を示した。これらは、測定ポイント1, 2での吸光度の平均値に基づいて検量線 (1) を用いて演算した場合、測定ポイント14, 15での吸光度の平均値に基づいて検量線 (2) を用いて演算した場合のそれぞれについて示した。これらの測定に当たっては、各患者尿A, B, Cのサンプル数を10とし、濃度演算の基礎となる吸光度は、先に説明したのと同様の条件で測定した。

【0030】

患者尿A, B, Cは、相対的に低濃度であるが、このような低濃度領域における標準偏差 (SD) および相対標準偏差 (CV) は、検量線 (1) を用いた場合に比べて検量線 (2) を用いた場合のほうが小さくなっている。つまり、低濃度領域では、検量線 (2) を用いた場合のほうが再現性が良い (測定誤差が小さい) と言える。

【0031】

【表 2】

	検量線 (1)			検量線 (2)		
	測定ポイント 1, 2			測定ポイント 14, 15		
	患者尿 A	患者尿 B	患者尿 C	患者尿 A	患者尿 B	患者尿 C
平均値 (mg/dL)	11.5	24.6	107.8	12.6	29.9	111.6
S D	2.6	2.7	3.8	1.8	1.8	3.4
C V (%)	22.7	11.0	3.5	14.6	6.1	3.0

## 【0032】

以上の知見から、本実施の形態では、相対的に高濃度の反応液については測定ポイント 1, 2 での吸光度の平均値に基づいて作成した検量線 (1) を用い、相対的に低濃度の反応液については測定ポイント 14, 15 での吸光度の平均値に基づいて作成した検量線 (2) を用いることとしている。なお、2つの測定ポイントの平均値により検量線を作成するのは、測定誤差による影響を少なくするためである。

## 【0033】

次に、本実施の形態の濃度演算手順を、図 2 を参照しつつ、図 5 に示したフローに則して説明する。まず、測定ポイント 1, 2 での吸光度 (A), (B) を測定するとともに (S1)、測定ポイント 14, 15 での吸光度 (a), (b) を測定する (S2)。もちろん、一定時間毎 (たとえば 21.5 秒毎) に吸光度を測定し、その測定値から測定ポイント 1, 2 および測定ポイント 14, 15 に相当する吸光度をピックアップしてもよい。

## 【0034】

次いで、測定ポイント 1, 2 での吸光度 (A), (B) の平均値 (C) を演算し (S3)、この平均値 (C) と検量線 (1) とに基づいて第 1 濃度 (D) を演算する (S4)。その一方、測定ポイント 14, 15 での吸光度 (a), (b) の平均値 (c) を演算し (S5)、この平均値 (c) と検量線 (2) とに基づいて第 2 濃度 (d) を演算する (S6)。

## 【0035】

次いで、第2濃度(d)が濃度演算用閾値よりも大きいかなんかを判断する(S7)。つまり、測定対象物質の濃度が相対的に大きなものであるか、あるいは相対的に小さなものであるかを予想する。ここで、濃度演算用閾値は、たとえば第1および第2検量線(1)、(2)ともに直線性が高い濃度範囲(200~300 mg/dLの範囲)内、あるいは第1検量線(1)と第2検量線(2)との交点に相当する濃度(400 mg/dL強)に設定される。測定対象物質の濃度が濃度用閾値よりも大きいかなんかの予想は、光学的応答値が予め定められた光学的応答値用閾値よりも大きいかなんかに基づいて行ってもよい。

## 【0036】

第2濃度(d)が濃度演算用閾値よりも大きいと判断された場合には(S7: YES)、第1濃度(D)と第2濃度(d)との大きさを比較し(S8)、値の大きなほうを採用する(S9, S10)。つまり、第1濃度(D)のほうが大きければ(S8: YES)、最終的な演算結果として第1濃度(D)を採用し(S10)、第2濃度(d)のほうが大きければ(S8: NO)、最終的な演算結果として第2濃度(d)を採用する(S9)。

## 【0037】

図2から分かるように、第2検量線(2)はプロゾン現象が生じているのに対して、第1検量線(1)はプロゾン現象が生じていない。そのため、第1検量線(1)での演算結果と第2検量線(2)での演算結果を比較して値の大きなものを採用すれば、第2検量線(2)においてプロゾン現象が生じているために低値となる濃度領域では、プロゾン現象が生じていない第1検量線(1)での演算値が採用され、これによりプロゾンの影響を回避することができるようになる。

## 【0038】

一方、第2濃度(d)が濃度演算用閾値よりも小さいと判断された場合には(S7: NO)、プロゾン現象が生じているために第2濃度(d)が小さいのか、あるいは単に濃度が小さいのかを判断する(S11)。プロゾン現象が生じているために第2濃度(d)が小さいのであれば(S11: YES)、最終的な演算結果としては、プロゾン現象が生じていない検量線(1)での演算値であ

る第1濃度(D)を採用する(S10)。一方、プロゾン現象が生じておらず単に第2濃度(d)が小さいのであれば(S11:NO)、最終的な演算結果として第2濃度(d)をそのまま採用する(S9)。

#### 【0039】

以上に説明した手順では、第2検量線(2)を用いた場合にプロゾン現象の影響を受ける相対的に高濃度な濃度範囲については、プロゾン現象の生じない第1検量線(1)での演算結果が採用される。そのため、検量線(1)、(2)の使い分けという簡易な手法によりプロゾン現象の影響を極力回避して、再測定することなく高濃度領域での演算を適切に行えるようになる。また、低濃度領域については、第2検量線(2)を用いて演算された第2濃度(d)が採用されるため、低濃度領域での再現性が高くなる。

#### 【0040】

このような効果は、図6に示した手順に則して濃度演算を行った場合にも享受することができる。この濃度演算手順では、まず図5に示したフローのS1~S6と同様にして、第1濃度(D)および第2濃度(d)を演算する(S20~S25)。次いで、第1濃度(D)が濃度演算用閾値よりも大きいかな否かを判断する(S26)。つまり、第1濃度(D)を基準として、これを濃度演算用閾値と比較して、測定対象物質の相対的に大きなものであるか、あるいは相対的に小さなものであるかが判断される。この点において、図5に示した濃度演算手順とは異なっている。つまり、図5の手順では、第2検量線(2)を用いて演算した第2濃度(d)が濃度演算用閾値よりも大きいかな否かを判断していた。

#### 【0041】

S26での判断の結果、第1濃度(D)が濃度演算用閾値よりも大きければ(S26:YES)、つまり相対的に高濃度であると判断された場合には、プロゾン現象の生じない第1検量線(1)での演算結果である第1濃度(D)を採用する(S27)。一方、第1濃度(D)が濃度演算用閾値よりも小さければ(S26:NO)、つまり相対的に低濃度であると判断された場合には、再現性の高い第2検量線(2)での演算結果である第2濃度(d)を採用する(S28)。この濃度演算手順では、プロゾン検知が不要であるという利点もある。



## 【0042】

なお、図6に示した濃度測定手順においても、濃度演算用閾値は、第1および第2検量線(1)，(2)ともに直線性が高い濃度範囲(200～300mg/dLの範囲)内、あるいは第1検量線(1)と第2検量線(2)との交点に相当する濃度(400mg/dL強)に設定される。後者のように濃度演算用閾値が定められる場合には、結局S27およびS28において、第1および第2検量線(1)，(2)での演算結果のうち、値の大きなほうを採用されることとなる。言い換えれば、第1濃度(D)と第2濃度(d)との大小を比較して、値の大きなほうを採用したのと同様な結果となる。もちろん、第1検量線(1)と第2検量線(2)との交点を境界として、これよりも高濃度領域については第1検量線(1)における対応部分を採用し、低濃度領域については第2検量線(2)における対応部分を採用した1本の検量線を作成し、これを用いて濃度演算を行うようにしても同様な結果となる。この場合には、第1濃度(D)や第2濃度(d)を濃度演算用閾値と比較したり、第1濃度(D)と第2濃度(d)とを比較する必要はないといった利点を得られる。

## 【0043】

次に、本願発明の第2の実施の形態を説明する。本実施の形態では、図7に示した複数の検量線(A)～(H)を使い分けて、濃度演算が行われる。これらの検量線(A)～(H)は、測定ポイント1，3，5，7，9，11，13，15において測定された吸光度に基づいて作成されている。図7は、図3のグラフを作成する際に測定した値を用いて、横軸を濃度とし、同一の測定ポイントの群によって複数の検量線(A)～(H)を作成して図示したものである。

## 【0044】

これらの検量線を用いて濃度演算を行う場合には、図8に示したように、まず上記した測定ポイントにおいて吸光度を測定する(S30)。次いで、測定ポイント1での吸光度に基づいて、複数の検量線(A)～(H)の中から濃度演算に最適な検量線を選択する(S31)。最後に、最適検量線とこれに対応する測定ポイントでの吸光度とに基づいて濃度演算を行う(S32)。

## 【0045】

ここで、初期測定値（測定ポイント1での測定値）に基づいて検量線の選択を行うのは次の理由による。すなわち、低濃度反応液については、プロゾン現象が生じていないために、反応平衡に近い部分の吸光度を採用するのが好ましい反面、高濃度反応液については、プロゾン現象が生じるために、測定された吸光度のうちのピーク値を採用するのが好ましい。一方、図3から分かるように、測定対象物質の濃度が大きいほど、初期測定値（測定ポイント1での測定値）が大きくなっている。図3からはさらに、各濃度における最大吸光度は、濃度が小さくなるにしたがって測定ポイントが大きな部分（反応時間の長い部分）に移行していくといった特性が見受けられる。したがって、初期測定値に基づけば、測定対象物質の濃度や最大測定値を予想することができる。そのため、本実施の形態では、初期測定値（測定ポイント1での測定値）に基づいて検量線の選択を行うこととしている。

#### 【0046】

本実施の形態では、複数の検量線を作成しておく必要がある反面、プロゾン検知が不要であり、また濃度演算用閾値を設定し、これとの比較を行った上で検量線を選択する必要もないため、濃度測定手順が簡略化されるといった利点がある。また、相対的に低濃度なものについては、測定ポイントの小さい（反応時間が短い）ときの吸光度に基づいて作成された検量線が選択されるため、低濃度物質を測定する際の再現性が良好なものとなる。

#### 【0047】

なお、本実施の形態においては、7つの測定ポイントについて作成された検量線を用いて濃度演算を行う場合について説明したが、検量線の数7つよりも多くてもよいし、7つよりも小さくてもよい。また、第1の実施の形態のように、2つの測定ポイントの平均値として複数の検量線を作成し、これらを用いて同様な手順により濃度演算を行うようにしてもよい。

#### 【0048】

本実施の形態では、複数の検量線を作成して、最大測定値に近い値に基づいて濃度が演算されるようになされていたが、これと類似の手法として、図9に実線で示したように、横軸に濃度、縦軸に各濃度における最大測定値として検量線（

$\alpha$ ) を作成することが考えられる。図 9 には、測定ポイント 1, 2 の吸光度により作成した検量線 (1) と、測定ポイント 14, 15 の吸光度により作成した検量線 (2) とを同時に示している。図 9 から分かるように、検量線 ( $\alpha$ ) は、相対的に高濃度領域ではプロゾン現象の生じていない検量線 (1) に関連している一方、相対的に低濃度領域では再現性の高い検量線 (2) に関連している。したがって、検量線 ( $\alpha$ ) を用いれば、本願発明の第 1 の実施の形態と同様な効果を楽しむことができる。さらには、プロゾン検知が不要であり、また検量線を選択するといった手順も不要となる。

#### 【0049】

上述の実施の形態では、光学的応答値に基づいて濃度を演算する場合を例にとって説明したが、本願発明は、反応系の種類によっては、反応系に電圧を印加し、あるいは電流を流したときの電氣的な応答値、反応の進行に伴う振動数の変化、反応系に光や振動を与えたときの熱的な応答などに基づいて濃度を演算する場合にも適用することができる。

#### 【図面の簡単な説明】

##### 【図 1】

光学的応答値の測定方法を説明するための概略図である。

##### 【図 2】

本願発明の第 1 の実施の形態に係る濃度演算で用いる第 1 および第 2 検量線 (1), (2) を示すグラフである。

##### 【図 3】

吸光度の経時的变化について、濃度の異なる複数の標準反応液について示したグラフである。

##### 【図 4】

低濃度領域でのダイナミックレンジを示すグラフである。

##### 【図 5】

濃度演算手順を説明するためのフロー図である。

##### 【図 6】

他の濃度演算手順を説明するためのフロー図である。

【図 7】

本願発明の第 2 の実施の形態に係る濃度演算で用いる複数の検量線(A)～(H)を示すグラフである。

【図 8】

濃度演算手順を説明するためのグラフである。

【図 9】

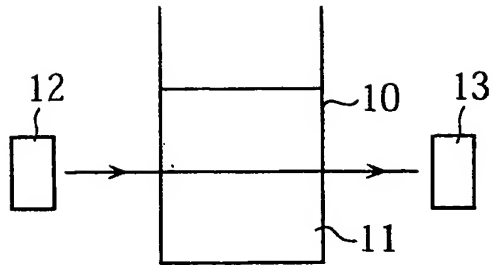
検量線 ( $\alpha$ ) を説明するためのグラフである。

【書類名】

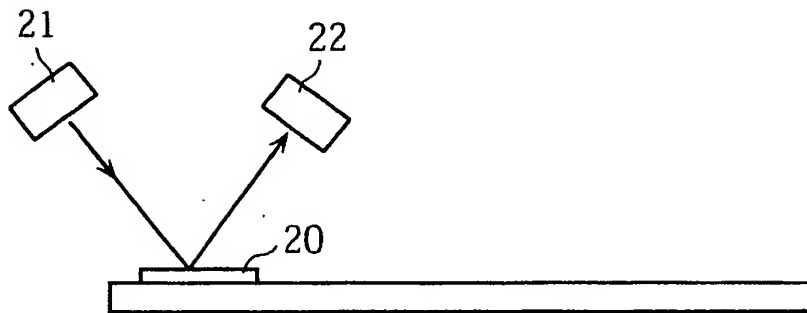
図面

【図 1】

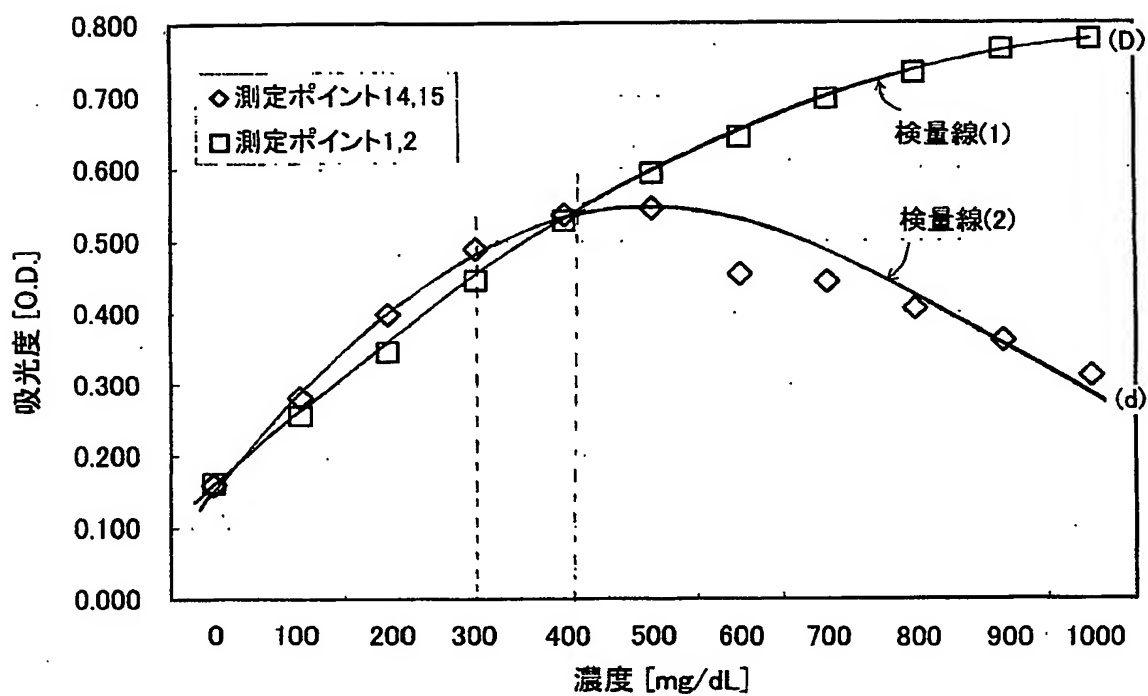
(a)



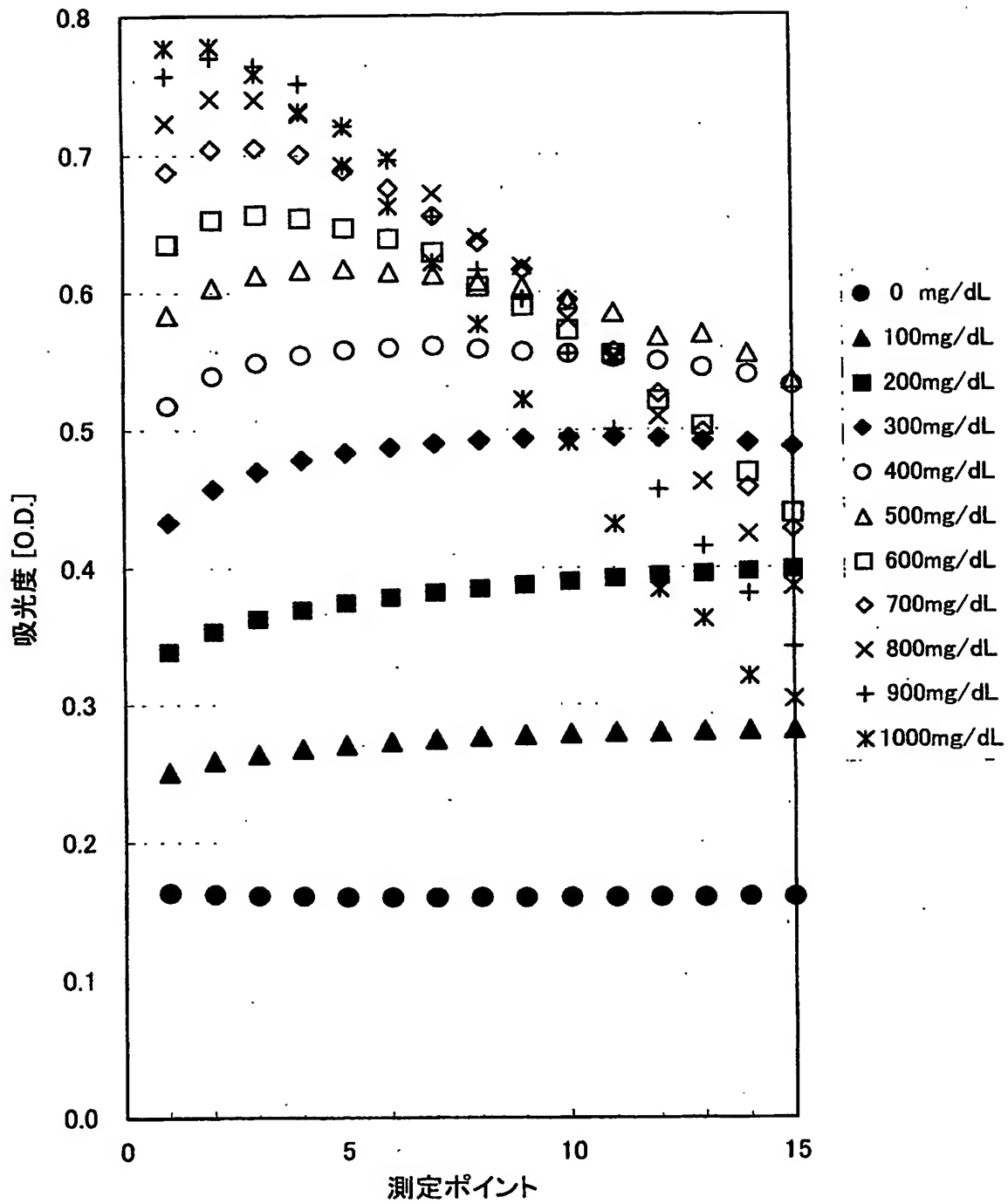
(b)



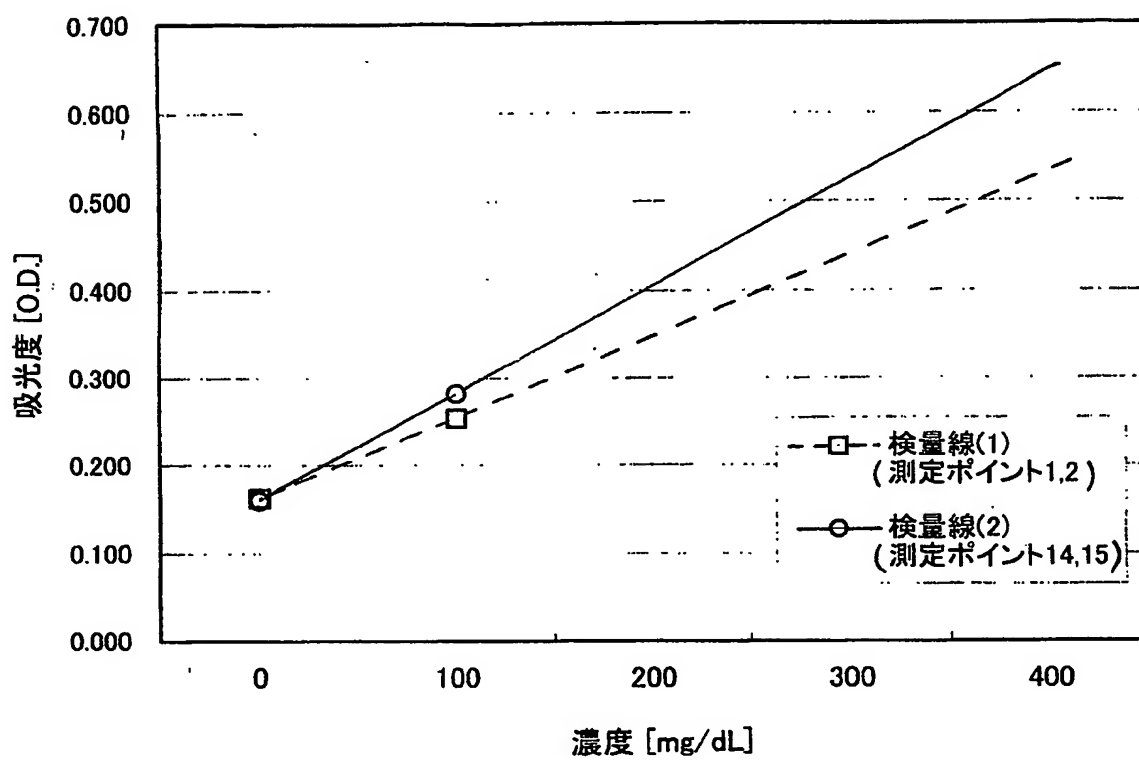
【図 2】



【図 3】

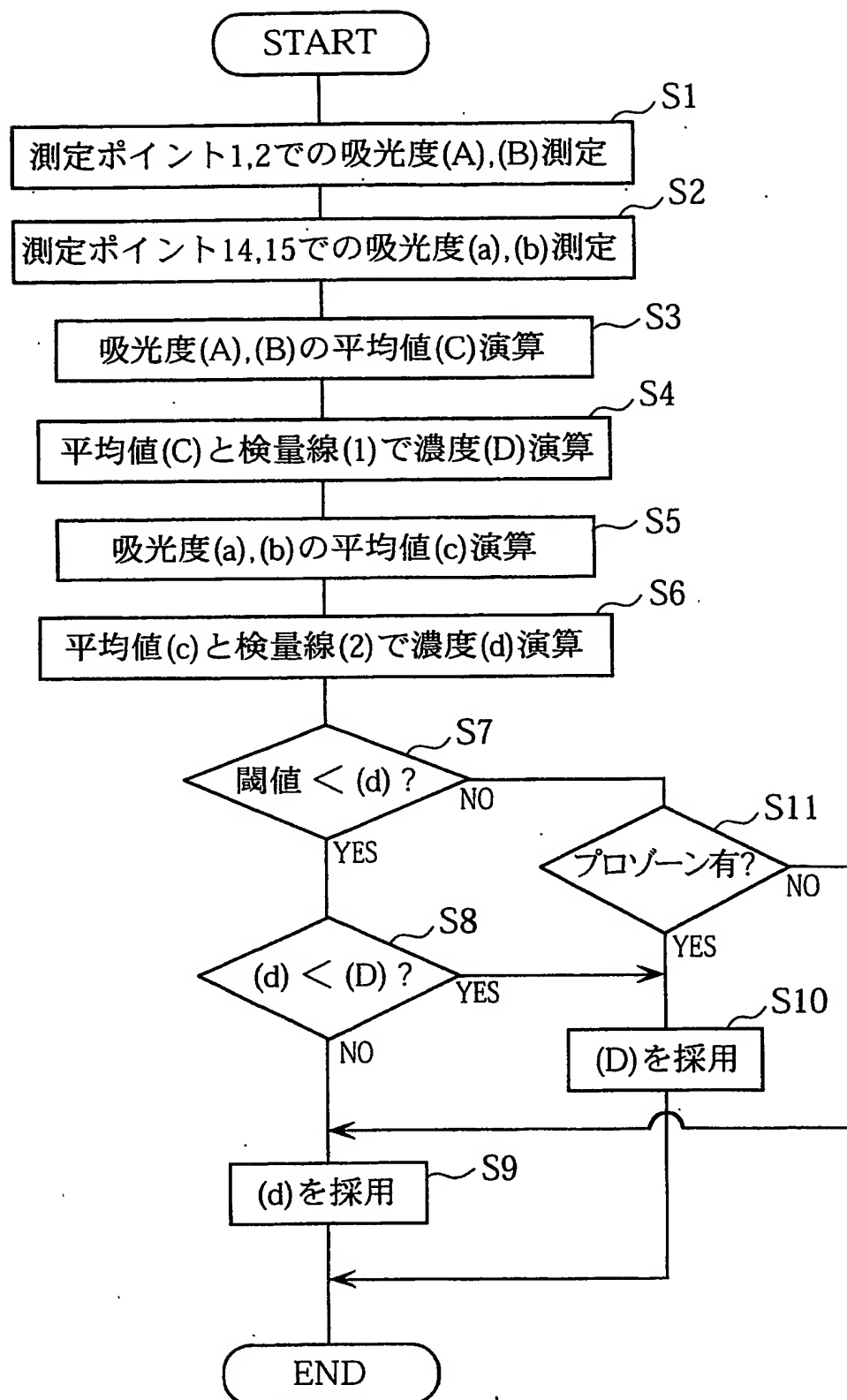


【図 4】

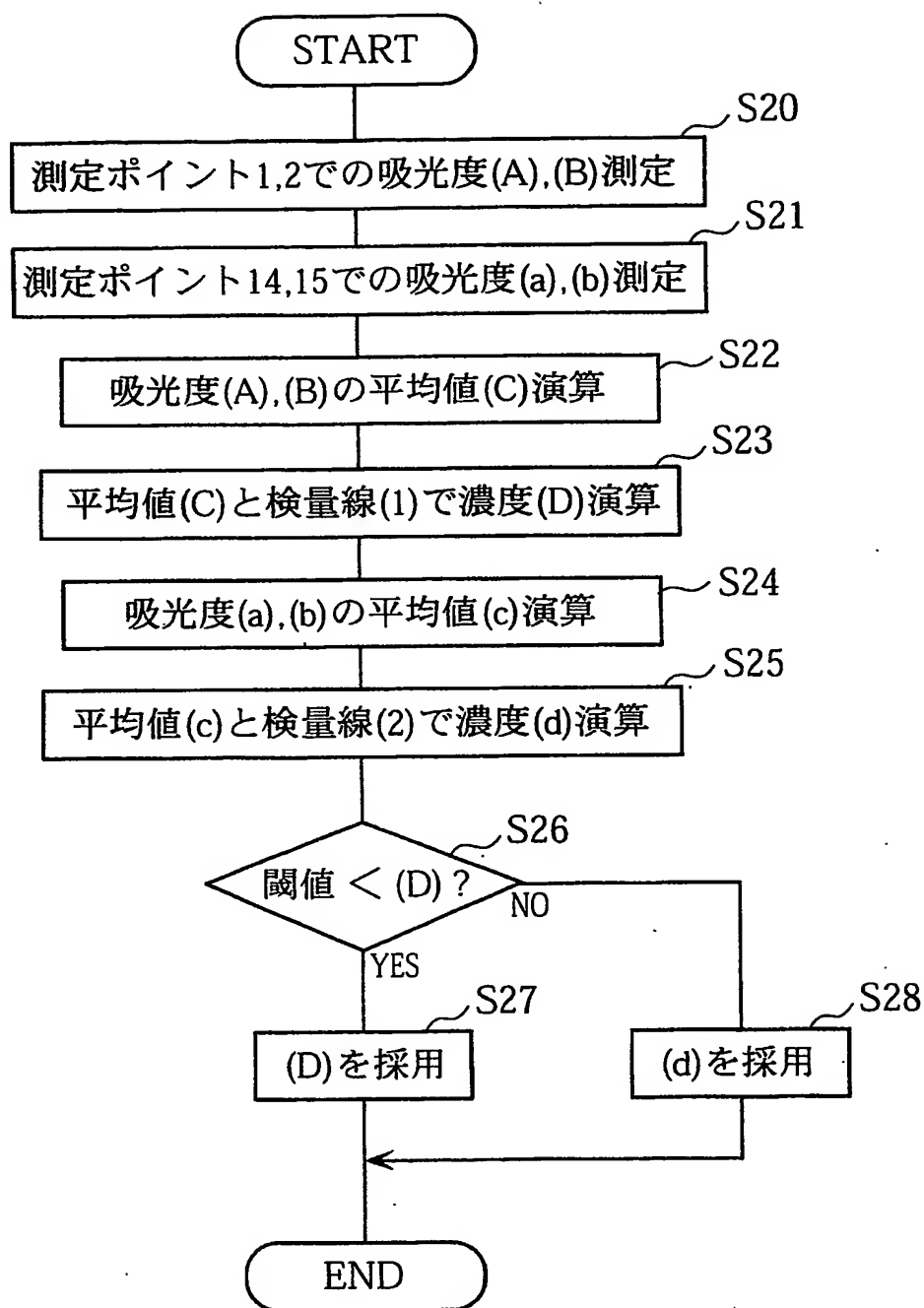




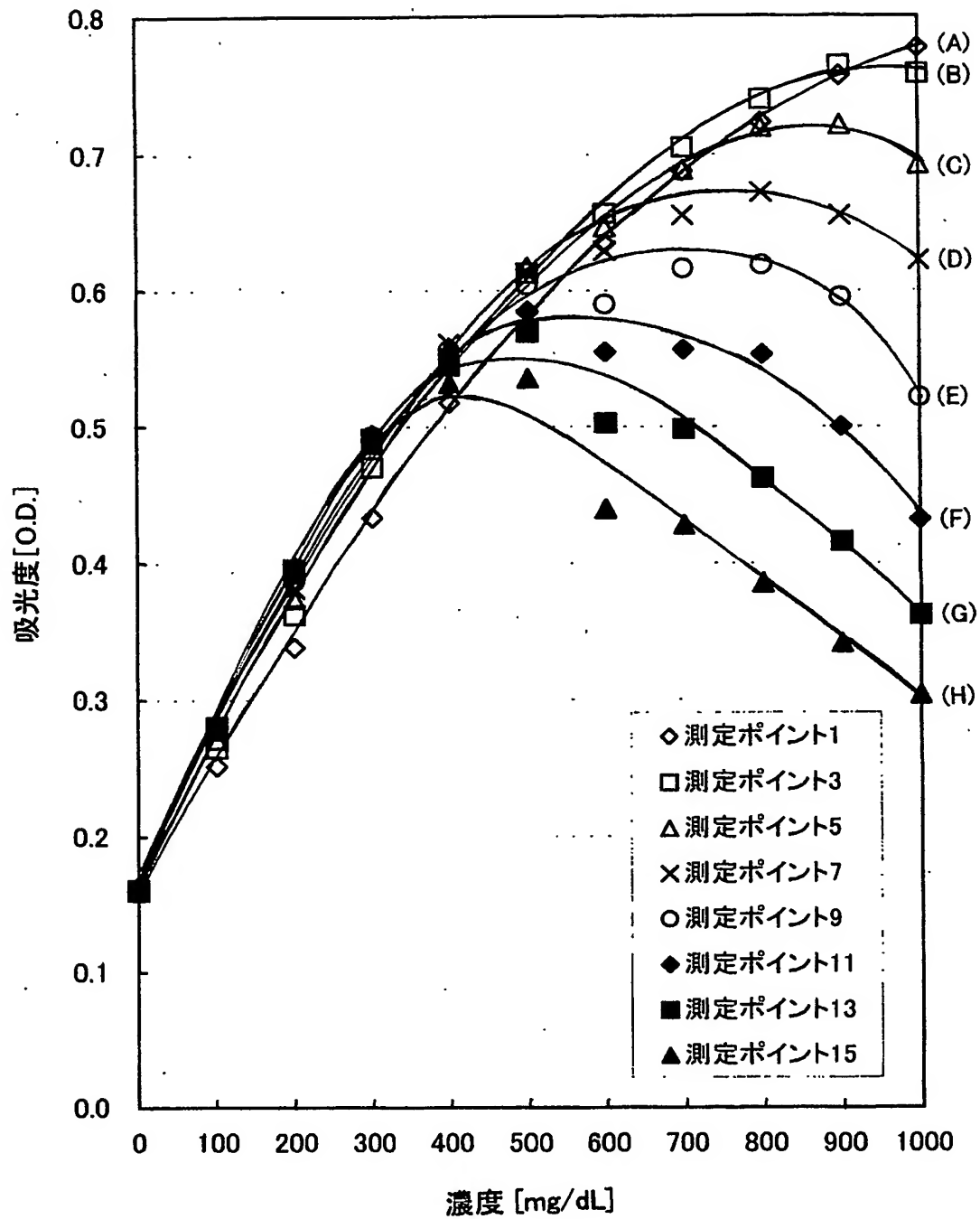
【図5】



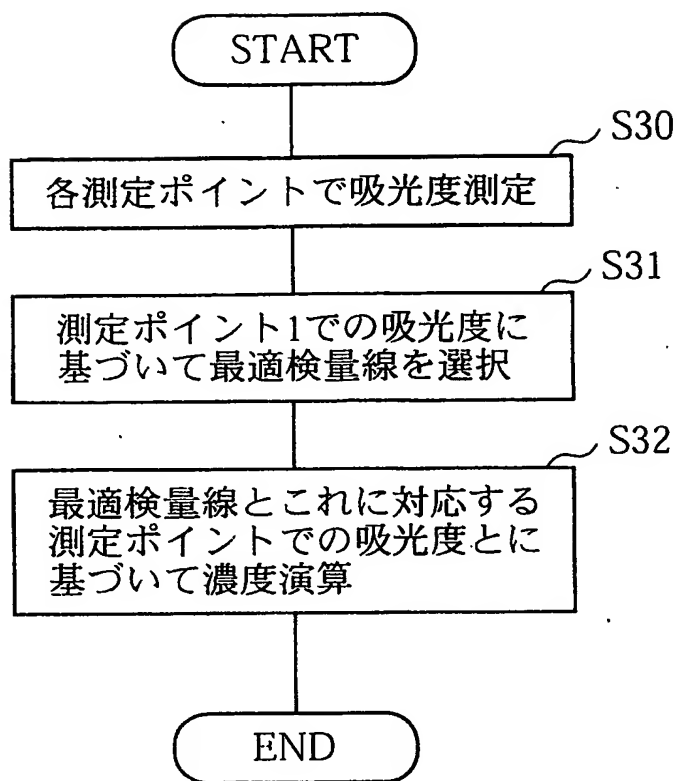
【図6】



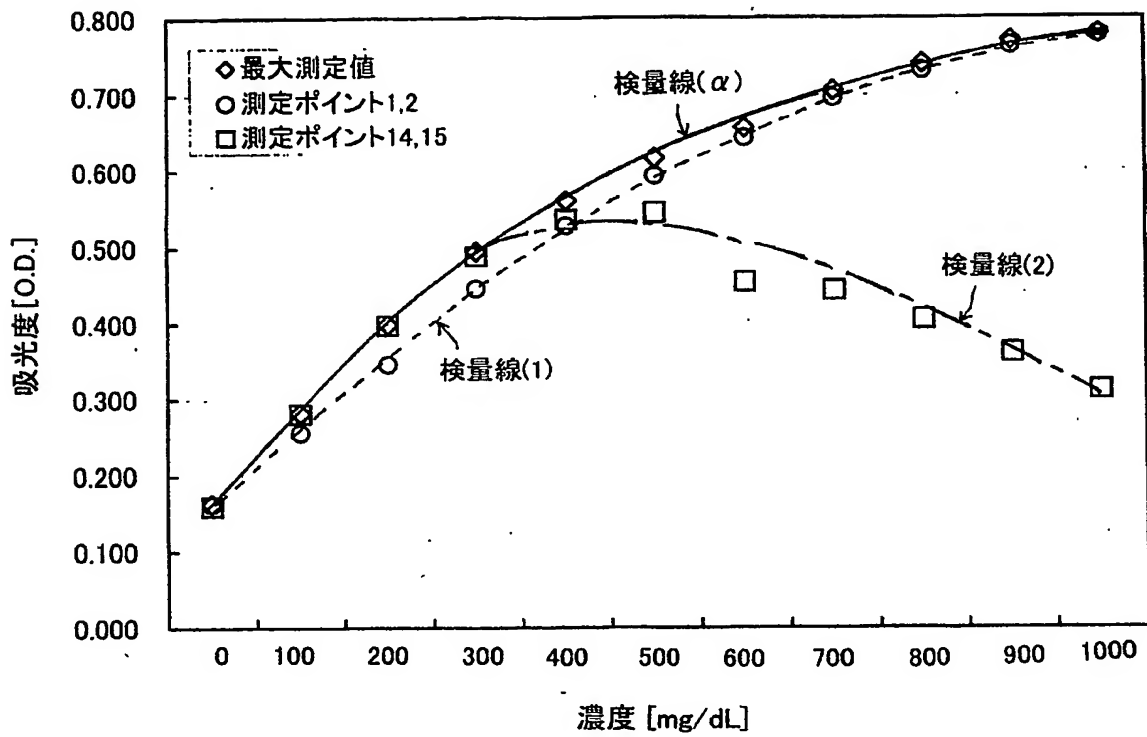
【図 7】



【図8】



【図9】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 プロゾン様現象などの影響を回避しつつ、簡易かつ安価に濃度測定を行う。

【解決手段】 反応系からの出力値（例えば反応系に光を照射したときの光学的応答値）に基づいて、複数の検量線の中から測定対象物質の濃度演算に最も適合した検量線を選択し、当該検量線および出力値に基づいて測定対象物質の濃度演算を行う濃度測定方法において、複数の検量線として、相互に異なる反応時間を基礎として作成されたものを用いる。好ましくは、複数の検量線は、測定対象物質の濃度が予め定められた濃度用閾値よりも大きいと予想される場合に選択される第1検量線と、小さいと予想される場合に選択される第2検量線と、を有している。第1検量線は、反応初期において測定される出力値に基づいて作成され、第2検量線は、反応平衡時において測定される出力値に基づいて作成されたものを使用するのが好ましい。

【選択図】 図2

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000141897]

1. 変更年月日 2000年 6月12日

[変更理由] 名称変更

住 所 京都府京都市南区東九条西明田町57番地

氏 名 アークレイ株式会社